

Estrategias para el tratamiento de residuos, generación de bioenergía y avances medioambientales para una economía sostenible

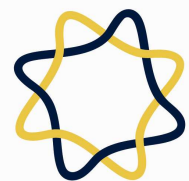
Juan M. González Grau



Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología,
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
Sevilla



jmgrau@irnase.csic.es



REDOMIC



Indice



- Introducción

- Microorganismos y su diversidad

- Estrategias biotecnológicas



- Ejemplo.

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Introducción



Aportaciones de la biotecnología a la solución de problemas ambientales

¿Qué tipo de problemas podemos resolver?

¿Cómo puede contribuir la biotecnología?

Problemas ambientales		Contribuciones biotecnológicas	
Disminución de recursos	→	Utilización de recursos renovables	
Contaminación	→	Reducción de contaminantes	
Aumento de residuos	→	Aprovechamiento de residuos	
Destrucción del entorno	→	Mejora sistemas productivos	

Microorganismos y su diversidad



Importancia de nuestro medio ambiente

- Fuente de recursos e información

Enorme biodiversidad

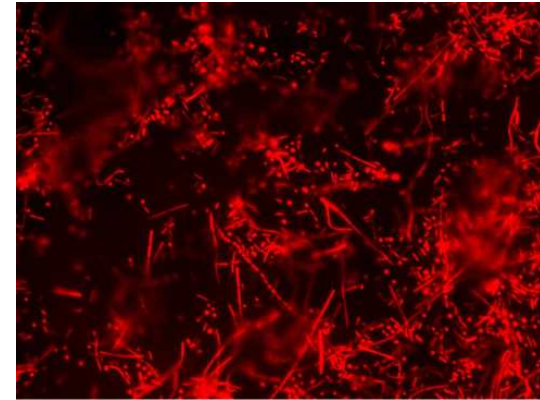
Organismos y el equilibrio de los ecosistemas

Microorganismos y sus habitats

- Comprender el funcionamiento de nuestro planeta

Ciclos biogeoquímicos y reciclaje natural de compuestos

Información genómica y regulación en los microorganismos



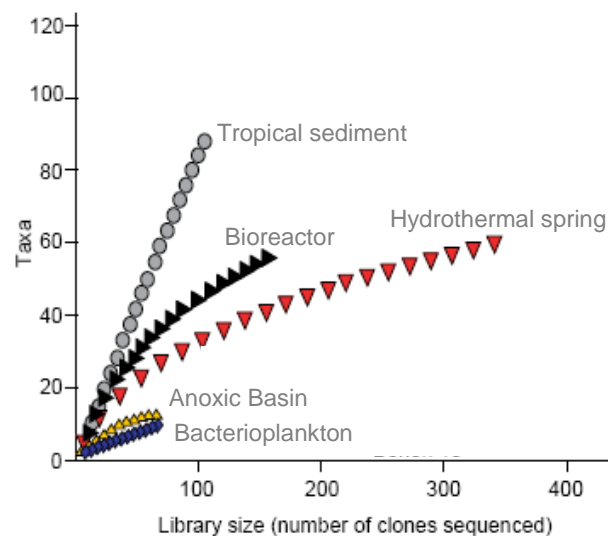
Microorganismos y su diversidad



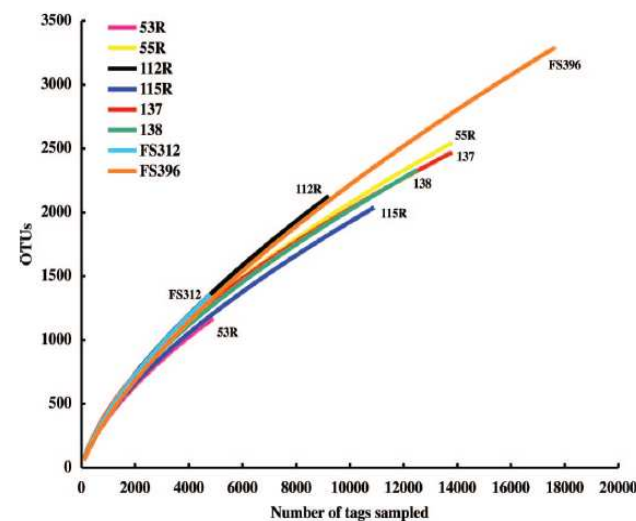
Diversidad microbiana

La diversidad microbiana es superior a lo que las técnicas actuales permiten determinar

Hay más microorganismos en 1 g suelo que estrellas en nuestra galaxia



Kemp and Aller, 2004



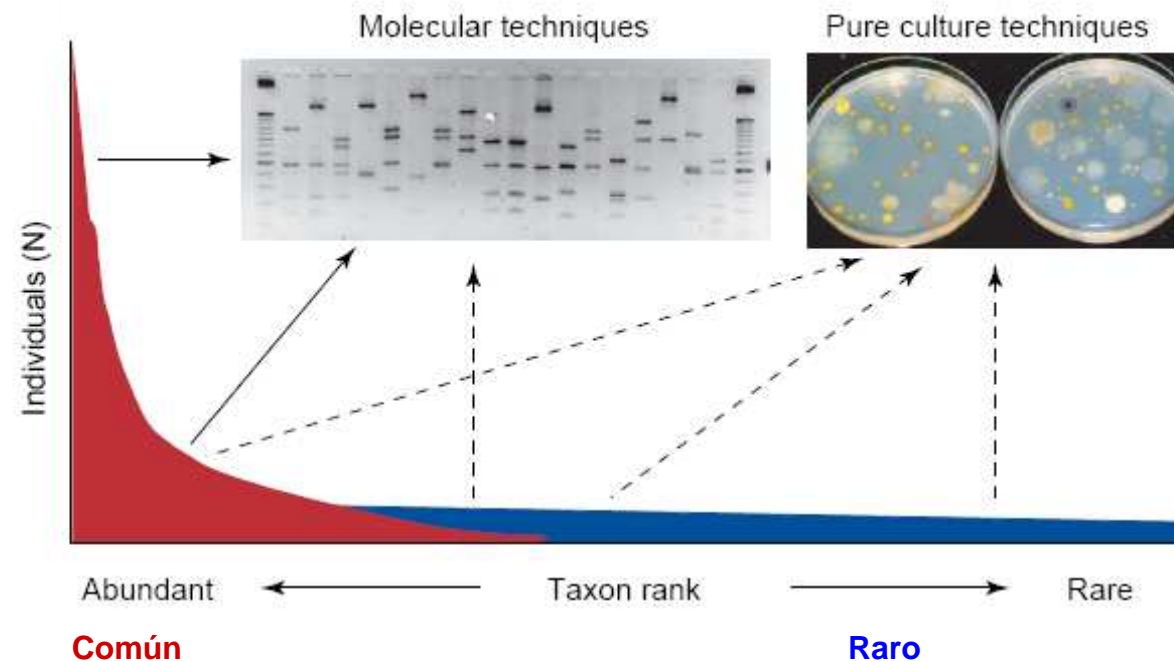
Sogin et al. 2006

Microorganismos y su diversidad

Los microorganismos no viven solos

Las comunidades microbianas son muy complejas y están compuestas por unos pocos microorganismos abundantes y muchos poco abundantes

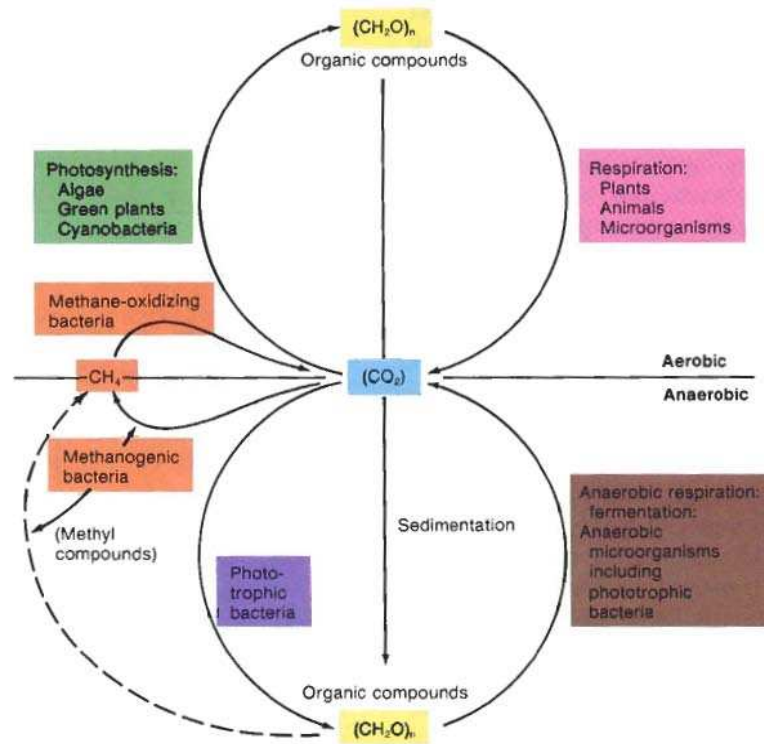
Aún desconocemos la existencia de muchos microorganismos



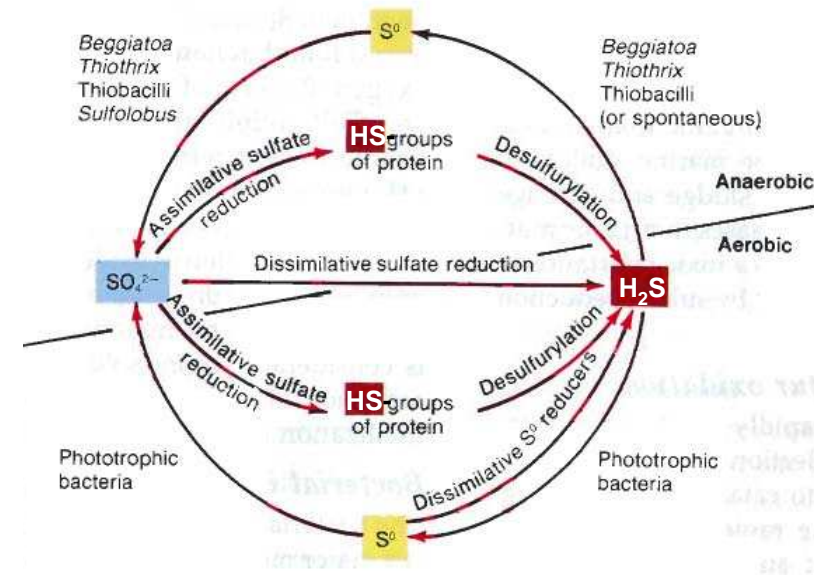
Microorganismos y su diversidad

Papel de los microorganismos en la naturaleza

Numerosos pasos de los ciclos biogeoquímicos de los elementos los llevan a cabo únicamente los microorganismos



Ciclo del Carbono



Ciclo del Azufre

Microorganismos y su diversidad

Los microorganismos son los únicos capaces de degradar numerosos compuestos contaminantes

Los microorganismos interaccionan entre si y con su entorno

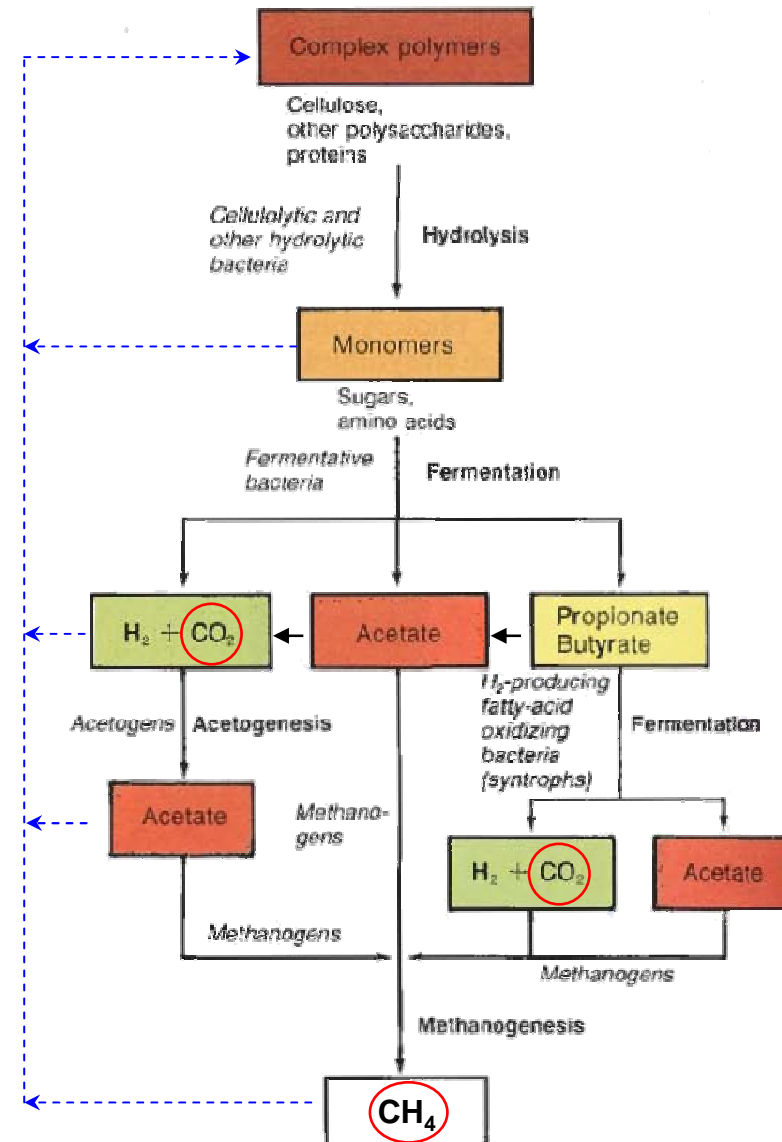
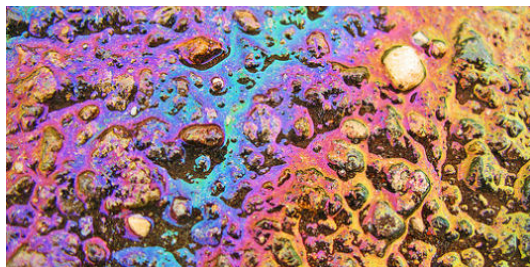
Ejemplos:

Residuos vegetales (celulosa, lignina)

Compuestos aromáticos y derivados del petróleo

Pesticidas y compuestos organoclorados

Otros residuos recalcitrantes



Microorganismos y su diversidad



Diversidad microbiana incluye su taxonomía, metabolismo, sistemas de funcionamiento y regulación

Toda la información de un organismo se encuentra en su genoma

Pseudomonas putida



Pseudomonas putida
(plásmido)



Acinetobacter sp. ADP1



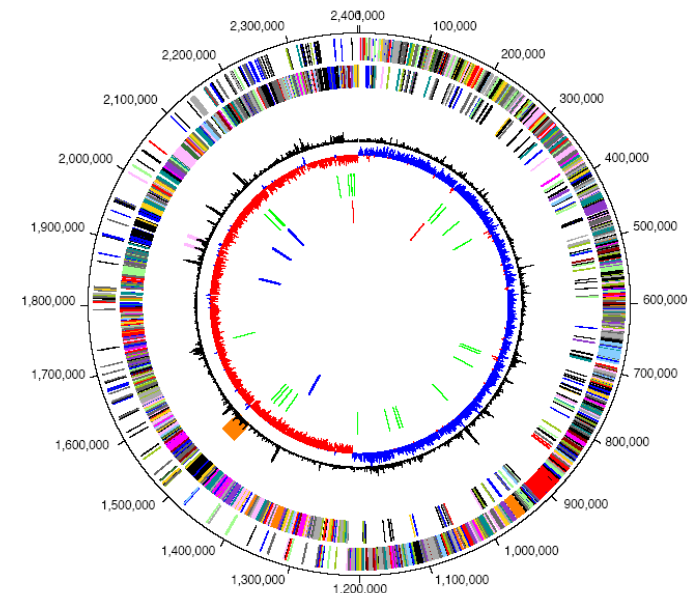
Burkholderia sp. ADP1



Burkholderia sp.
(plásmido)



Organización de genes implicados en la degradación de clorobenzoatos en Bacteria



Genoma de *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*

Estrategias biotecnológicas



Existen diversas estrategias para aplicar la biotecnología al medio ambiente

- Aislamiento de microorganismos específicos
- Genómica, metagenómica. Búsqueda de genes determinados
- Modificación de microorganismos y/o genes
- Tratamiento de residuos
 - En el medio ambiente
 - En reactores
- Producción de biocombustibles
- Análisis de procesos/tratamientos (Métodos de detección y monitorización)
- Procesos naturales. Estudio y potenciación



Estrategias biotecnológicas



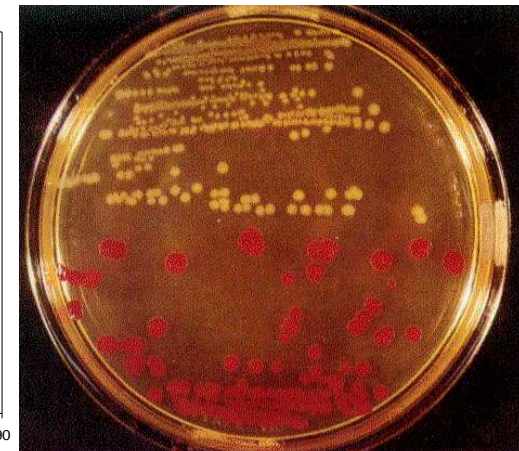
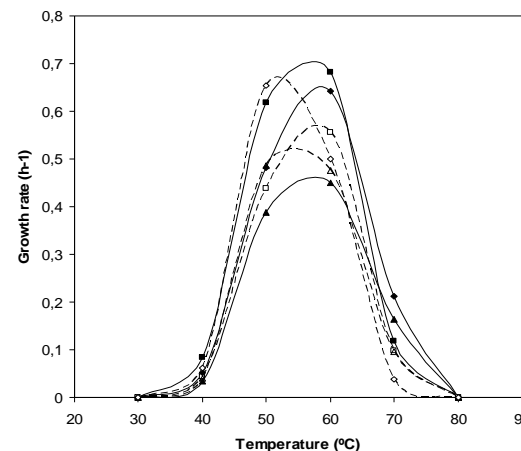
Aislamiento de microorganismos específicos

El cultivo y aislamiento de microorganismos es importante para el estudio de sus capacidades metabólicas y su empleo en distintos tratamientos

Se buscan microorganismos capaces de llevar a cabo procesos determinados y de forma más eficiente

Ejemplos

- Degradación de compuestos clorados, compuestos derivados del petróleo y otros compuestos recalcitrantes
- Detoxificación de metales (Hg)
- Que actúan como fertilizantes
- Y un largo número de procesos



Estrategias biotecnológicas



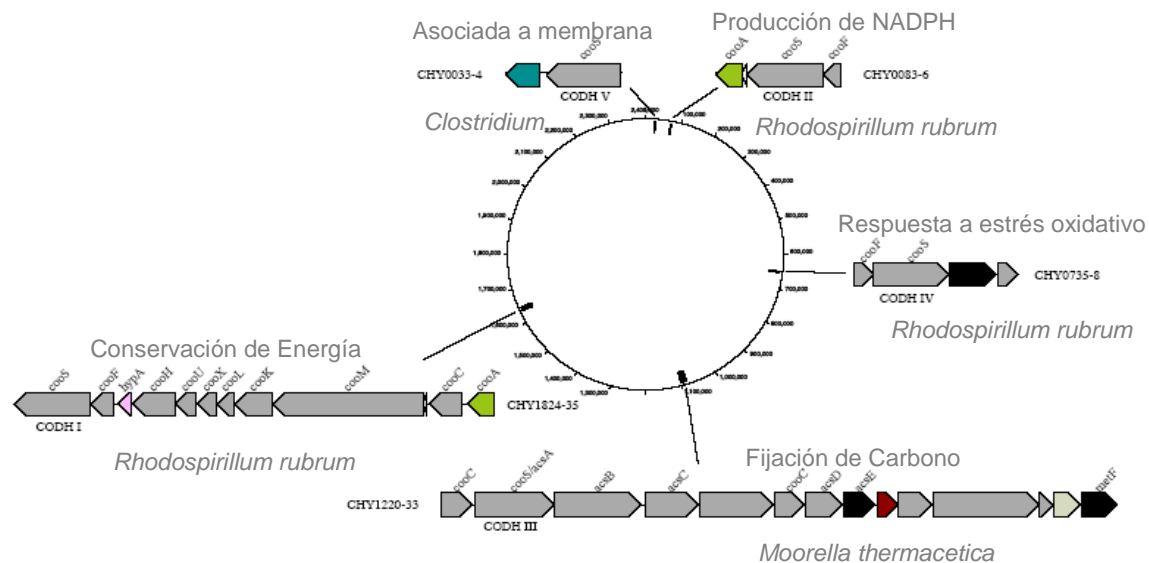
Genómica, metagenómica. Búsqueda de genes determinados

Genómica. Análisis del genoma de un organismo

Metagenómica. Análisis de la información genómica de una comunidad

Búsqueda de genes más eficientes, para nuevos procesos, etc.

Estos genes (enzimas) pueden ser producidos en grandes cantidades y llevar a cabo numerosas transformaciones o análisis.



Permiten estudiar:

- Sistemas de regulación
- Evitar la necesidad de cultivar microorganismos para su estudio

Estrategias biotecnológicas



Modificación de microorganismos y/o genes

Microorganismos (GMM; Genetically Modified Microorganisms)

Introducción de genes nuevos o más eficientes

Bloqueo o potenciación de rutas metabólicas

Incremento de la resistencia

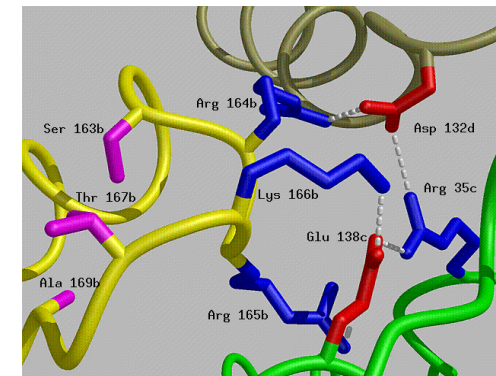
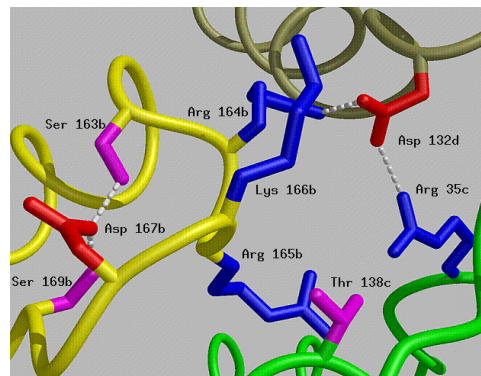
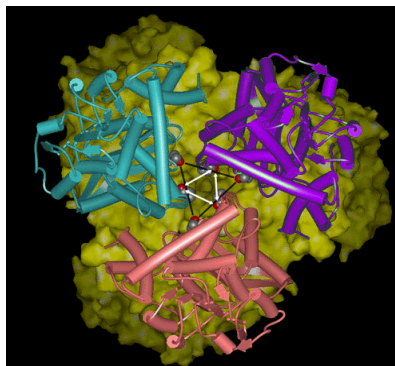
Generación de sensores



Escherichia
genéticamente
transformada para
producir grandes
cantidades de
isobutanol

Genes. Modificación de la secuencia y estructura de proteínas (enzimas)

Mutantes más eficientes, resistentes, etc.



Estrategias biotecnológicas



Tratamiento de residuos

- En el medio ambiente

Difícil. Existen muchos factores que aún se desconocen

- En reactores

La acumulación de residuos requiere su tratamiento

Requieren un estudio de optimización

En el tratamiento se obtienen otros productos útiles y/o bioenergía



Estrategias biotecnológicas



Tratamiento de residuos. Ejemplos

- En el medio ambiente

Adición de bacterias degradadoras de contaminantes

- En reactores

Tratamiento de residuos de industrias agroalimentarias (Aceite, etc.)

Production of biocombustibles a partir de residuos vegetales

Plantas de tratamiento de aguas



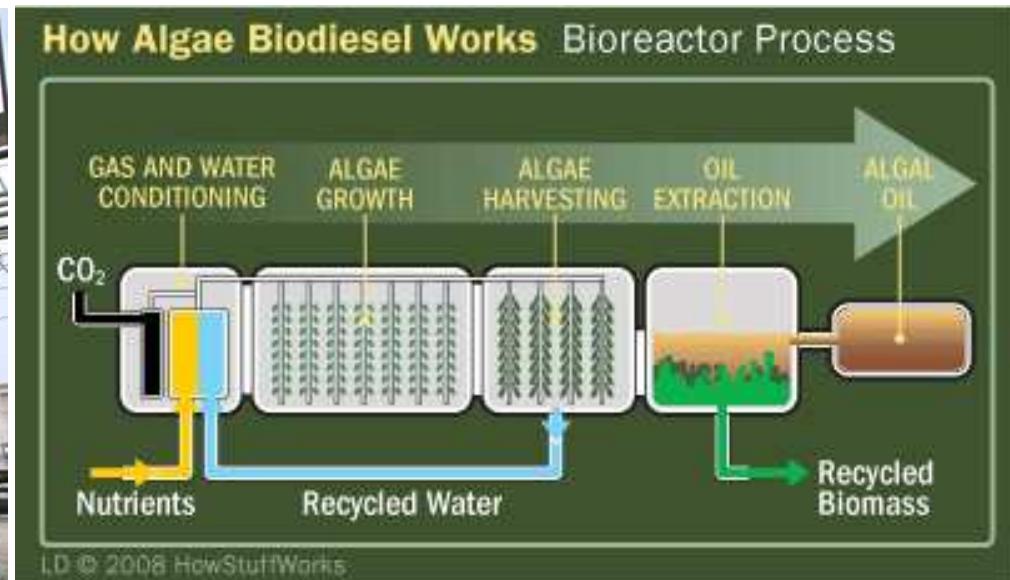
Estrategias biotecnológicas



Producción de biocombustibles

Producción de Biocombustible a partir de residuos vegetales

Producción de Biodiesel a partir de algas/cianobacterias



Estrategias biotecnológicas



Análisis de procesos/tratamientos

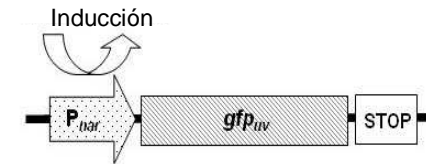
Aplicaciones para sistemas de detección y monitorización

Un ejemplo es la utilización de proteínas fluorescentes

Ejemplos

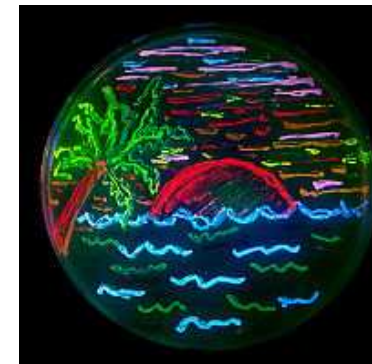
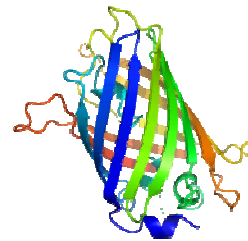
Detección de compuestos tóxicos

Monitorización de procesos



Aequorea victoria

GFP (Green-Fluorescent Protein)



Bacterias que expresan distintas proteínas fluorescentes

Estrategias biotecnológicas



Procesos naturales. Estudio y potenciación

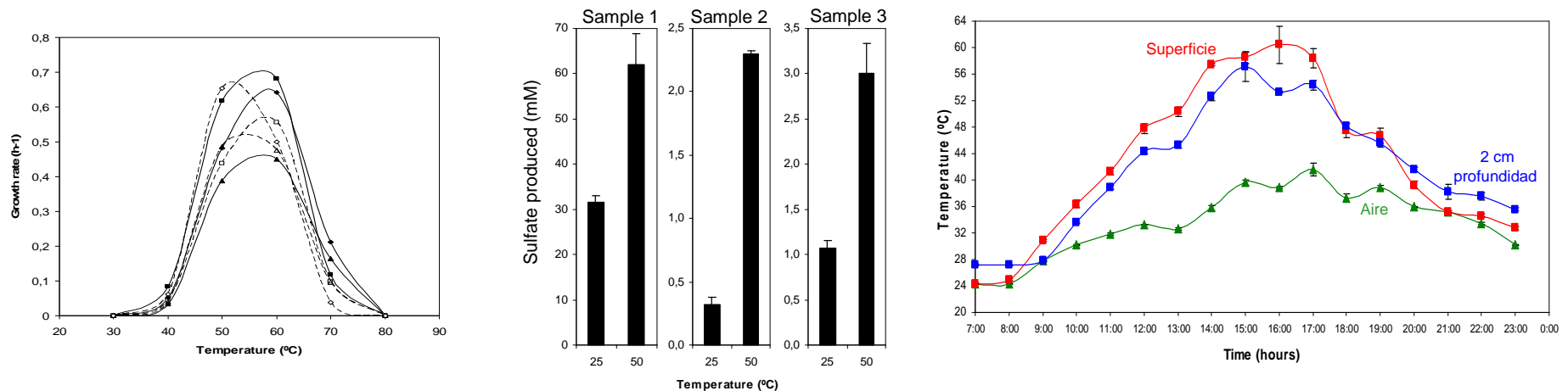
Los procesos naturales pueden ser potenciados.

Requieren una buena comprensión del proceso y sus consecuencias

Un ejemplo:

Biofertilización utilizando bacterias termófilas

Estas bacterias producen amonio, sulfatos y fosfatos a partir de la degradación de materia orgánica



Ejemplo



Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Rafael Borja y Bárbara Rincón (Instituto de La Grasa, CSIC)

Juan M. González y M. Carmen Portillo (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC)

Tratamiento anaerobio del residuo sólido resultante de la producción de aceite de girasol

Producción de Biogas

Estudio de los microorganismos implicados en el proceso

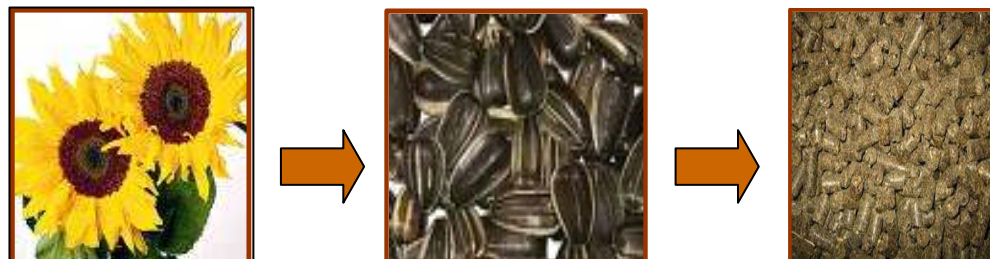
Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

La harina de girasol es el residuo sólido producido en el proceso de extracción de aceite de girasol.

Sólo en España, se producen 4-5 millones de toneladas anuales

La digestión anaerobia permite el tratamiento de residuos vegetales donde intervienen comunidades microbianas complejas

Durante este proceso se pueden obtener cantidades importante de biogas, una mezcla de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) con gran valor energético ($21,4 \text{ MJ m}^{-3}$).



Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol



Los objetivos del estudio fueron:

Evaluar el potencial bioquímico de metano (Methane Biochemical Potencial (BMP) o máxima cantidad de metano que un substrato puede producir

Estudiar la influencia del inóculo sobre la producción de biogas. Se compararon tres inóculos diferentes

Estudiar los cambios que experimenten las comunidades microbianas

Determinar los microorganismos más característicos implicados en el proceso

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol



Composición y características de la harina de girasol

Parameter	Value
Moisture (%)	7.0
Total protein (%)	23.4
Fats (%)	1.4
Carbohydrates (%)	58.7
Hemicellulose (%)	9.2
Lignin (%)	9.5
Cellulose (%)	21.7
TS (%)	93
MS (%)	6.5
VS (%)	86.5
TCOD (g O ₂ g ⁻¹ TS dry basis)	1.15
Most abundant size range of particles (mm)	0.7-1.0
^a Mean values are averages of four determinations (The standard deviations were ≤ 0.05). ^b TS: total solids, MS: mineral solids, VS: volatile solids, TCOD: total chemical oxygen demand.	

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Los inóculos utilizados fueron:

- I.** Lodo granular anaerobio procedente de un reactor de tratamiento de aguas residuales de una industria de refrescos
- II.** Lodo anaerobio procedente de un reactor dedicado al tratamiento de biosólidos de aguas residuales urbanas
- III.** Lodo granular anaerobio procedente de un reactor de tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera

Características de los lodos utilizados

Sludge	pH	TS (g/L)	VS (g/L)
I	7.4	30	25
II	7.6	43	20
III	7.5	83	47

TS, Total solids; VS, Volatile Solids

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Los experimentos se realizaron en baños termostatzados a 35°C durante 12 d

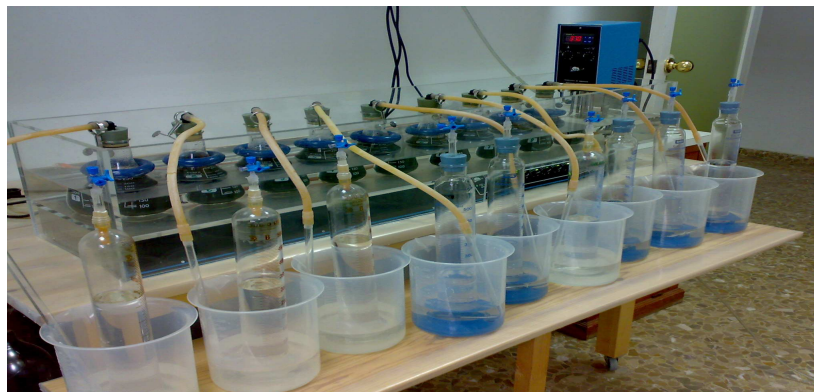
Las comunidades microbianas se analizaron por métodos moleculares basados en perfiles moleculares por DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), clonación de fragmentos del gen ARNr 16S y secuenciación

La producción de metano se ajustó por regresión no-lineal a un modelo de cinética de primer orden (ecuación de Roediger):

$$G = G_m [1 - \exp(-k_o t)]$$

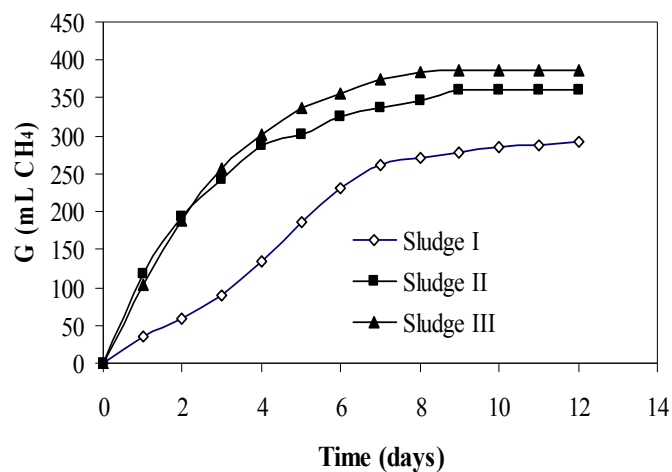
donde:

- G es el volumen (mL) de gas metano acumulado en t
- G_m es el volumen máximo acumulado
- k_o (día⁻¹) es la tasa de producción de CH₄
- t es el tiempo de digestión (días)



Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Los resultados obtenidos fueron:



Volumen de metano acumulado para los tres inoculos ensayados.

Valores de G_m y k_o (\pm SD) y porcentaje de sólidos volátiles (VS) eliminados durante el proceso

Sludge	R^2	G_m (mL CH ₄)	k_o (días ⁻¹)	VS (%)
I	0.9675	425 \pm 65	0.11 \pm 0.02	33
II	0.9989	366 \pm 2	0.37 \pm 0.01	42
III	0.9968	403 \pm 4	0.33 \pm 0.01	42

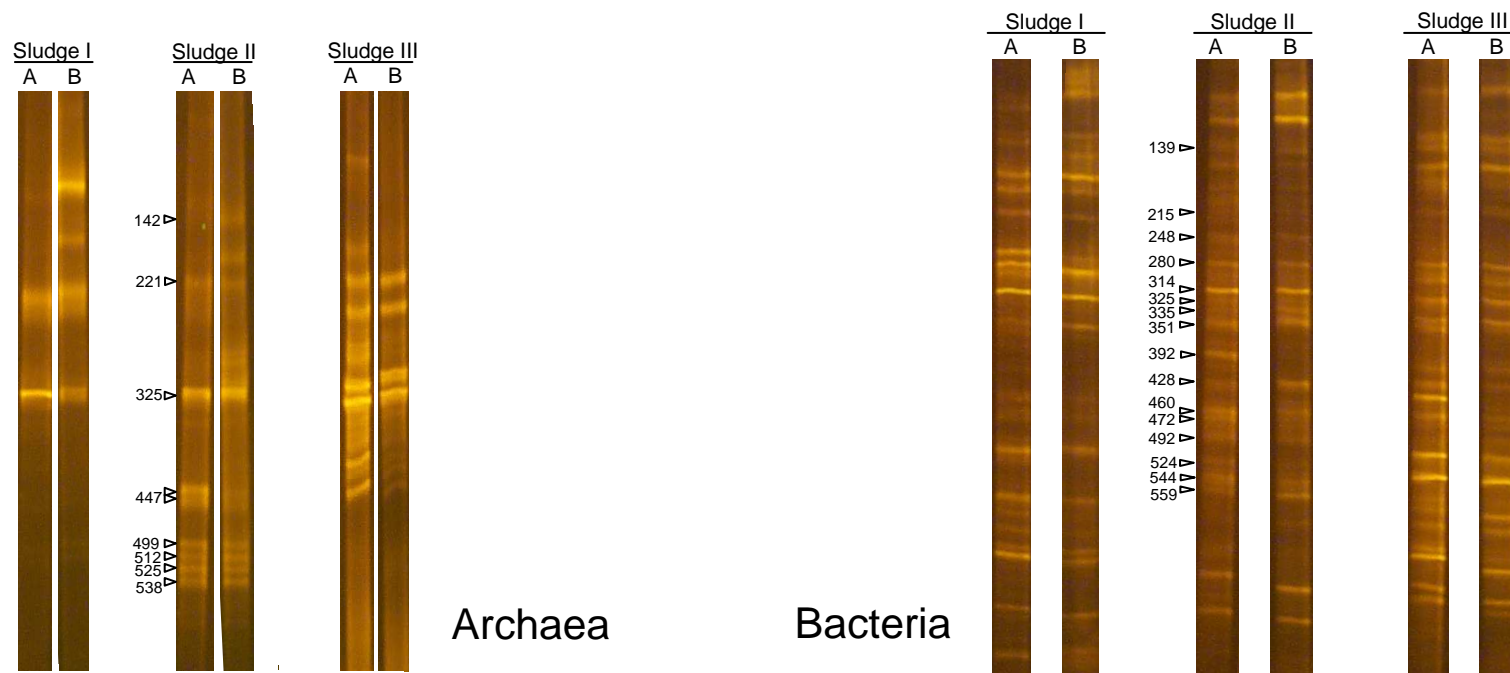
Se seleccionó el lodo II por su mayor tasa de producción de metano (k_o)

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Los resultados sobre los microorganismos que participan en el proceso son:

Se confirma la existencia de diferencias importantes entre los tres inoculos utilizados

La comunidades desarrolladas durante el proceso mantienen la estructura inicial de los inoculos para Bacteria y, en general, también para Archaea



Perfiles moleculares por DGGE de las comunidades microbianas (Bacteria y Archaea) en el inoculo (A) y al final de la digestión anaeróbica (B) para los tres lodos ensayados (I, II y III).

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Las principales bacterias en el proceso de digestión anaerobia del lodo II fueron:

Bacteria

Migration	Taxonomic affiliation (Accession No. of closest homologue)	Fraction inoculum ¹	Fraction BMP ¹
139	Chloroflexi (CU926181)	3.4	3.8
215	Betaproteobacteria (GU454925)	1.9	0.8
248	Candidate Division WS6 (AF423183)	3.4	1.6
280	Chloroflexi (EF174275)	3.0	2.7
314	Chloroflexi (CU924314)	6.6	5.9
325	Actinobacteria (AY426438)	2.0	1.3
335	Alphaproteobacteria (AJ440751)	1.2	3.8
351	Alphaproteobacteria (GQ500763)	5.3	6.7
392	<i>Thauera</i> , Betaproteobacteria (DQ098974)	5.6	1.0
428	Bacteroidetes (CU922674)	2.7	6.1
460	<i>Paracoccus</i> , Alphaproteobacteria (FJ386516)	5.7	4.8
472	Chromatiales, Gammaproteobacteria (AM176837)	4.4	1.5
492	Thermoanaerobacteriales, Firmicutes (EU878332)	2.1	2.5
524	<i>Synergistes</i> , Synergistetes (FN436049)	2.4	1.4
544	Firmicutes (CU919983)	6.9	3.8
559	Bacteroidetes (AB330856)	2.6	5.4
Total identified		59.2	53.1

Principales grupos (Divisiones):

Chloroflexi
Alphaproteobacteria
Bacteroidetes
Firmicutes
Betaproteobacteria

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Las principales arqueas en el proceso de digestión anaerobia del lodo II fueron:

Archaea

Migration	Taxonomic affiliation (Accession No. of closest homologue)	Fraction inoculum ¹	Fraction BMP ¹
142	Methanosarcinales (FJ705109)	6.0	7.7
221	<i>Methanosaeta</i> , Methanosarcinales (AB494241)	12.1	7.0
325	<i>Methanosaeta</i> , Methanosarcinales (FM162203)	20.5	28.8
447	Methanosarcinales (GU196156)	16.9	11.4
499	<i>Methanosaeta</i> , Methanosarcinales (EU591661))	6.4	6.3
512	Methanosarcinales (CU916012)	5.8	8.2
525	Methanomicrobiales (EU591675)	8.4	5.7
538	Methanomicrobiales (EU591675)	6.9	7.1
Total identified		83.0	82.2

Principales grupos (Orden):

Methanosarcinales (*Methanosaeta*)

Methanomicrobiales

Producción de biogas durante el tratamiento de residuos sólidos de la extracción de la harina de girasol

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren la importancia de seleccionar un inóculo adecuado para alcanzar la máxima producción de metano en menor tiempo

Las comunidades bacterianas permanecen estables a lo largo del proceso de digestión anaerobia

Las comunidades bacterianas estan dominadas por Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes y Firmicutes

Las comunidades de arqueas estan dominadas por Methanosarcinales (*Methanosaeta*) que son metanógenos acetoclásticos.

Ello implica que el papel fundamental de la comunidad bacteriana es la producción de acetato que será utilizado para producir metano por las arqueas



Agradecimientos



Instituto de La Grasa (CSIC):

Rafael Borja
Bárbara Rincón



Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (CSIC):

M^a Carmen Portillo

Gracias

